

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international(43) Date de la publication internationale  
11 mars 2004 (11.03.2004)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/020640 A3(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 15/74(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR2003/002606

(22) Date de dépôt international : 29 août 2003 (29.08.2003)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
02/10805 30 août 2002 (30.08.2002) FR(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) :  
INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE  
AGRONOMIQUE [FR/FR]; 147, rue de l'Université,  
F-75007 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : POQUET,  
Isabelle [FR/FR]; 56-62, rue de Vouillé, F-75015 Paris  
(FR). LLULL, Daniel [ES/FR]; 11, rue des Vignes,  
F-91300 Massy (FR).(74) Mandataires : VIALLE-PRESLES, Marie José etc.;  
CABINET ORES, 36, rue de Saint-Petersbourg, F-75008  
Paris (FR).(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ,  
BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ,  
DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,  
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,  
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,  
MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD,  
SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE,  
LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet  
eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet  
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK,  
TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,  
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

## Publiée :

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des  
revendications, sera republiée si des modifications sont re-  
çues

(88) Date de publication du rapport de recherche  
internationale: 29 avril 2004

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrévia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: ZINC-REGULATED PROKARYOTIC EXPRESSION CASSETTES

(54) Titre : CASSETTES D'EXPRESSION PROCARYOTES REGULEES PAR LE ZINC

(57) Abstract: The invention concerns prokaryotic expression cassettes comprising a promoter zinc-regulated by a *L. Lactis* zitR repressor. Said cassettes can be used for expressing genes of interest in gram-positive bacteria.(57) Abrégé : L'invention est relative à des cassettes d'expression procaryotes comprenant un promoteur régulé par le zinc par l'intermédiaire du répresseur zitR de *L. Lactis*. Ces cassettes peuvent être utilisées pour l'expression de gènes d'intérêt chez ces bactéries à gram-positif.

WO 2004/020640 A3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/74

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBL

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | DATABASE EMBL 'Online!<br>15 April 1998 (1998-04-15)<br>POQUET I. ET AL.: "Lactococcus lactis<br>putative lipoprotein Nlp3 precursor."<br>Database accession no. U95834<br>XP002239449<br>abstract  | 1-5,9,10              |
| A          | MIYOSHI A ET AL: "Controlled production<br>of stable heterologous proteins in<br>Lactococcus lactis."<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,<br>vol. 68, no. 6, June 2002 (2002-06), pages<br>3141-3146, XP002239446<br>ISSN: 0099-2240<br>the whole document | 1-11                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

\*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

\*E\* earlier document but published on or after the international filing date

\*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

\*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

\*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 March 2004

Date of mailing of the international search report

26/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mandl, B

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Publication No.  
 PCT/JP 03/02606

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | <p>POQUET I. ET AL.: "An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: Application to Lactococcus lactis."<br/>           JOURNAL OF BACTERIOLOGY,<br/>           vol. 180, no. 7, April 1998 (1998-04),<br/>           pages 1904-1912, XP002239447<br/>           ISSN: 0021-9193<br/>           cited in the application<br/>           table 1<br/>           page 1906, left-hand column, paragraph 4<br/>           ---</p> | 1-11                  |
| A          | <p>BOLOTIN ALEXANDER ET AL: "The complete genome sequence of the lactic acid bacterium Lactococcus lactis ssp. lactis IL1403."<br/>           GENOME RESEARCH,<br/>           vol. 11, no. 5, May 2001 (2001-05), pages<br/>           731-753, XP001109416<br/>           ISSN: 1088-9051<br/>           the whole document<br/>           ---</p>   | 1-11                  |
| A          | <p>US 6 207 146 B1 (HONG WANJIN ET AL)<br/>           27 March 2001 (2001-03-27)<br/>           abstract<br/>           -----</p>   | 1-11                  |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

| Patent document<br>cited in search report |    | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|----|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 6207146                                | B1 | 27-03-2001          | AU 722341 B2               | 27-07-2000          |
|   |    |                     | AU 4935896 A               | 16-10-1996          |
|   |    |                     | BR 9607831 A               | 30-11-1999          |
|   |    |                     | EP 0815251 A1              | 07-01-1998          |
|   |    |                     | GB 2314332 A ,B            | 24-12-1997          |
|   |    |                     | HK 1005248 A1              | 07-04-2000          |
|   |    |                     | JP 11502705 T              | 09-03-1999          |
|   |    |                     | NO 974367 A                | 24-11-1997          |
|   |    |                     | NZ 303133 A                | 29-11-1999          |
|   |    |                     | AP 730 A                   | 04-02-1999          |
|   |    |                     | CA 2216174 A1              | 03-10-1996          |
|   |    |                     | WO 9630531 A1              | 03-10-1996          |
|   |    |                     | CN 1185180 A               | 17-06-1998          |
|   |    |                     | HU 9800520 A2              | 29-06-1998          |
|   |    |                     | IL 117594 A                | 10-11-2002          |

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/74

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| X          | DATABASE EMBL 'Online!<br>15 April 1998 (1998-04-15)<br>POQUET I. ET AL.: "Lactococcus lactis<br>putative lipoprotein Nlp3 precursor."<br>Database accession no. U95834<br>XP002239449<br>abstract  | 1-5, 9, 10            |
| A          | MIYOSHI A ET AL: "Controlled production<br>of stable heterologous proteins in<br>Lactococcus lactis."<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,<br>vol. 68, no. 6, June 2002 (2002-06), pages<br>3141-3146, XP002239446<br>ISSN: 0099-2240<br>the whole document | 1-11                  |
|            | ---<br>-/--   |                       |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 March 2004

Date of mailing of the international search report

26/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mandl, B

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PC 03/02606

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
|------------|---|-----------------------|
| A          | <p>POQUET I. ET AL.: "An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: Application to Lactococcus lactis."<br/>JOURNAL OF BACTERIOLOGY,<br/>vol. 180, no. 7, April 1998 (1998-04),<br/>pages 1904-1912, XP002239447<br/>ISSN: 0021-9193<br/>cited in the application<br/>table 1<br/>page 1906, left-hand column, paragraph 4</p> | 1-11                  |
| A          | <p>BOLOTIN ALEXANDER ET AL: "The complete genome sequence of the lactic acid bacterium Lactococcus lactis ssp. lactis IL1403."<br/>GENOME RESEARCH,<br/>vol. 11, no. 5, May 2001 (2001-05), pages<br/>731-753, XP001109416<br/>ISSN: 1088-9051<br/>the whole document</p>   | 1-11                  |
| A          | <p>US 6 207 146 B1 (HONG WANJIN ET AL)<br/>27 March 2001 (2001-03-27)<br/>abstract</p>  | 1-11                  |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internati

plication No

PCT

u3/02606

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member(s) | Publication<br>date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| US 6207146                                | B1                  | 27-03-2001                 |                     |
|   |                     | AU 722341 B2               | 27-07-2000          |
|   |                     | AU 4935896 A               | 16-10-1996          |
|   |                     | BR 9607831 A               | 30-11-1999          |
|   |                     | EP 0815251 A1              | 07-01-1998          |
|   |                     | GB 2314332 A ,B            | 24-12-1997          |
|   |                     | HK 1005248 A1              | 07-04-2000          |
|   |                     | JP 11502705 T              | 09-03-1999          |
|   |                     | NO 974367 A                | 24-11-1997          |
|   |                     | NZ 303133 A                | 29-11-1999          |
|   |                     | AP 730 A                   | 04-02-1999          |
|   |                     | CA 2216174 A1              | 03-10-1996          |
|   |                     | WO 9630531 A1              | 03-10-1996          |
|   |                     | CN 1185180 A               | 17-06-1998          |
|   |                     | HU 9800520 A2              | 29-06-1998          |
|   |                     | IL 117594 A                | 10-11-2002          |

---

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N15/74

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, MEDLINE, BIOSIS, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie * | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-------------|--|-------------------------------|
| X           | DATABASE EMBL 'en ligne!<br>15 avril 1998 (1998-04-15)<br>POQUET I. ET AL.: "Lactococcus lactis<br>putative lipoprotein Nlp3 precursor."<br>Database accession no. U95834<br>XP002239449<br>abrégé   | 1-5,9,10                      |
| A           | MIYOSHI A ET AL: "Controlled production<br>of stable heterologous proteins in<br>Lactococcus lactis."<br>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY,<br>vol. 68, no. 6, juin 2002 (2002-06), pages<br>3141-3146, XP002239446<br>ISSN: 0099-2240<br>le document en entier<br>-/-- | 1-11                          |

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*Z\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

5 mars 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

26/03/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Mandl, B

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/SA/210 03/02606

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

| Catégorie | Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents   | no. des revendications visées |
|-----------|--|-------------------------------|
| A         | <p>POQUET I. ET AL.: "An export-specific reporter designed for gram-positive bacteria: Application to Lactococcus lactis."</p> <p>JOURNAL OF BACTERIOLOGY,<br/>vol. 180, no. 7, avril 1998 (1998-04),<br/>pages 1904-1912, XP002239447<br/>ISSN: 0021-9193<br/>cité dans la demande<br/>tableau 1<br/>page 1906, colonne de gauche, alinéa 4</p> | 1-11                          |
| A         | <p>BOLOTIN ALEXANDER ET AL: "The complete genome sequence of the lactic acid bacterium Lactococcus lactis ssp. lactis IL1403."</p> <p>GENOME RESEARCH,<br/>vol. 11, no. 5, mai 2001 (2001-05), pages<br/>731-753, XP001109416<br/>ISSN: 1088-9051<br/>le document en entier</p>  | 1-11                          |
| A         | <p>US 6 207 146 B1 (HONG WANJIN ET AL)<br/>27 mars 2001 (2001-03-27)<br/>abrégé</p>  | 1-11                          |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 03/02606

| Document brevet cité<br>au rapport de recherche | Date de<br>publication | Membre(s) de la<br>famille de brevet(s) | Date de<br>publication |
|---|------------------------|---|------------------------|
| US 6207146                                      | B1                     | 27-03-2001                              |                        |
|   |                        | AU 722341 B2                            | 27-07-2000             |
|   |                        | AU 4935896 A                            | 16-10-1996             |
|   |                        | BR 9607831 A                            | 30-11-1999             |
|   |                        | EP 0815251 A1                           | 07-01-1998             |
|   |                        | GB 2314332 A , B                        | 24-12-1997             |
|   |                        | HK 1005248 A1                           | 07-04-2000             |
|   |                        | JP 11502705 T                           | 09-03-1999             |
|   |                        | NO 974367 A                             | 24-11-1997             |
|   |                        | NZ 303133 A                             | 29-11-1999             |
|   |                        | AP 730 A                                | 04-02-1999             |
|   |                        | CA 2216174 A1                           | 03-10-1996             |
|   |                        | WO 9630531 A1                           | 03-10-1996             |
|   |                        | CN 1185180 A                            | 17-06-1998             |
|   |                        | HU 9800520 A2                           | 29-06-1998             |
|   |                        | IL 117594 A                             | 10-11-2002             |

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## CASSETTES D'EXPRESSION PROCARYOTES REGULEES PAR LE ZINC

L'invention concerne la production de protéines hétérologues chez des bactéries à Gram-positif, notamment des bactéries lactiques.

5 A coté de leurs usages traditionnels dans l'industrie agro-alimentaire, les bactéries lactiques sont actuellement de plus en plus utilisées en tant que cellules hôtes pour la production de protéines hétérologues d'intérêt. Ces protéines d'intérêt peuvent être de nature très variée, et il est donc souhaitable de disposer du choix le plus large possible d'outils d'expression pour pouvoir optimiser leur production en fonction des spécificités de chacune d'entre elles.

10 De manière générale, il est nécessaire d'utiliser des promoteurs forts, permettant d'obtenir un niveau d'expression suffisant du gène d'intérêt. Dans certains cas, on peut utiliser des promoteurs constitutifs ; dans d'autres cas (par exemple lorsque le produit du gène d'intérêt est toxique pour la bactérie hôte ou risque d'interférer avec le métabolisme de celle-ci), il est préférable d'utiliser des promoteurs  
15 inductibles, permettant de déclencher ou d'arrêter l'expression au moment souhaité.

Bien que les bactéries lactiques possèdent de nombreux gènes dont la transcription est régulée par divers facteurs, on ne dispose à l'heure actuelle que d'un choix relativement restreint de promoteurs inductibles utilisables en pratique pour la construction de cassettes d'expression de gènes d'intérêt (pour revue, cf. DE  
20 VOS, Curr. Op. Microbiol., 2, 289-295, 1999). En effet, cette utilisation demande non seulement que les promoteurs concernés soient régulables, mais encore qu'il existe un différentiel d'expression suffisant entre les différents états d'induction ; idéalement, l'expression doit atteindre un niveau élevé en conditions d'induction, et pouvoir être totalement bloquée en conditions de non-induction. En outre, il est nécessaire de  
25 pouvoir maîtriser facilement les facteurs intervenant dans la régulation de ces promoteurs.

Lors de travaux précédents, visant à identifier des protéines exportées de *L. lactis* (POQUET et al., J. Bacteriol., 180, 1904-1912, 1998), les Inventeurs ont cloné, en fusion avec le gène rapporteur  $\Delta_{SP}Nuc$ , un fragment d'ADN  
30 génomique de la souche *L. lactis* MG1363, comprenant un gène dénommé à l'époque *nlp3* (*New LipoProtein 3*), dont le produit présente des homologues avec une protéine de *S. pneumoniae* impliquée dans le transport des métaux. La séquence de ce fragment est disponible sur GENBANK sous le numéro U95834.

Les Inventeurs ont également observé que le gène *nlp3* était  
35 négativement régulé par des cations métalliques divalents, notamment  $Zn^{2+}$  (POQUET et al. « Use of a new reporter tool to demonstrate metal regulation of *nlp3*, a gene

putatively involved in metal uptake in *Lactococcus lactis* » ; 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Veldhoven, Pays-Bas, 19-23 septembre 1999).

D'autre part, dans le cadre du séquençage complet du génome de *L. lactis* IL1403, le gène *nlp3*, renommé *zitS*, a été identifié en tant que constituant d'un opéron, dénommé *zitRSQP* (BOLOTIN *et al.*, Antonie van Leeuwenhoek, 76, 27-76, 1999 ; BOLOTIN *et al.*, Genome Res. 11, 731, 2001). Par homologie avec des séquences connues, des fonctions putatives dans le transport du zinc ont été attribuées aux gènes de cet opéron. Ainsi, le produit du gène *zitP* constituerait la perméase du système de transport, les produits du gène *zitS* et du gène *zitQ* assureraient respectivement la liaison avec le substrat et la liaison avec l'ATP, et le produit du gène *zitR*, qui présente des homologies avec la famille de répresseurs transcriptionnels *marR*, serait impliqué dans la régulation du transport du zinc.

Il n'avait jusqu'à présent pas été envisagé d'utiliser le système de régulation de l'opéron *zitRSQP* pour contrôler l'expression de gènes hétérologues. En effet, bien qu'une régulation négative puisse être déclenchée par l'ajout de zinc (POQUET *et al.*, 1999 précité), le niveau d'expression de base observé en l'absence de cette régulation négative n'apparaissait pas suffisant pour permettre une production satisfaisante de protéines d'intérêt. En outre, on ignorait si le répresseur putatif ZitR était effectivement impliqué dans la répression de l'expression de cet opéron, et si d'autres régulateurs, notamment les régulateurs pléiotropes *flp*, décrits comme intervenant dans la régulation du transport du zinc chez *L. lactis* (GOSTICK *et al.*, Mol. Microbiol., 31, 1523-35, 1999 ; SCOTT *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 192, 85-89, 2000), pouvaient également être impliqués, soit en tant que co-répresseurs, soit au contraire en tant qu'activateurs éventuels.

Or, en poursuivant leurs études sur la régulation de l'opéron *zitRSQP*, les Inventeurs ont constaté, en présence de très faibles concentrations en  $Zn^{2+}$ , un niveau maximal d'expression beaucoup plus fort que ce que l'on pouvait supposer d'après les expérimentations antérieures, et qui permet d'atteindre un facteur d'induction supérieur à 100. En outre, ils ont constaté que l'expression était indépendante des régulateurs *flp*, et pouvait être totalement contrôlée par l'intermédiaire de la protéine ZitR.

L'étude de la structure du promoteur de l'opéron *zitRSQP* de *L. lactis* a permis aux Inventeurs de mettre en évidence, outre les éléments classiquement présents dans les promoteurs bactériens, à savoir les boîtes -35 (TTGACA) et -10 (TATAAT) séparées par 17pb, une séquence en palindrome chevauchant la boîte -35, qui représente très probablement le site de fixation de ZitR.

Les observations rapportées ci-dessus permettent de supposer que la régulation de *zitRSQP* s'effectue selon le mécanisme suivant : le répresseur ZitR peut former avec le  $Zn^{2+}$  intracellulaire un complexe présentant une affinité très importante pour le site de fixation chevauchant la boîte -35 ; le complexe ZitR- $Zn^{2+}$  fixé sur le palindrome empêche l'accès de l'ARN polymérase à la boîte -35, et réprime donc la transcription ; en revanche, la forme non-complexée de ZitR ne se fixe pas sur le site -35, permettant la transcription de l'opéron, qui s'effectue alors avec une grande efficacité.

La régulation de l'opéron *zitRSQP* par l'intermédiaire de ZitR dépend donc de la concentration intracellulaire en  $Zn^{2+}$ , elle-même fonction de la disponibilité en  $Zn^{2+}$  dans le milieu de culture.

L'opéron *zitRSQP* représente très probablement un système de transport du zinc de très haute affinité qui n'est utilisé par la bactérie que dans des conditions de carence en zinc très sévère, pour permettre la survie cellulaire ; en revanche, dans les conditions de culture habituelles sur milieux riches, le zinc est présent en abondance dans l'environnement, et transporté dans la cellule par des systèmes de moindre affinité que le complexe ZitSPQ, dont la synthèse est alors réprimée.

Ces propriétés du système de régulation de l'opéron *zitRSQP* de *L. lactis* mises en évidence par les Inventeurs permettent de proposer son utilisation pour la production de protéines d'intérêt dans des bactéries-hôtes, notamment des bactéries Gram-positif, et en particulier des bactéries lactiques.

La présente invention a pour objet les différents aspects de cette utilisation.

Selon une première variante, la présente invention a pour objet une cassette d'expression constituée par :

- un promoteur bactérien, dénommé ci-après  $p_{Zn}$ , contenant un site de fixation pour la protéine ZitR de *Lactococcus lactis*, lequel site comprend la séquence suivante :

AAAAATAANGTNNNNNNNTTGACATTATTTT

(SEQ ID NO:1),

dans laquelle TTGACA représente la boîte -35 dudit promoteur, et N représente A, C, G, ou T ;

- une séquence codant pour un polypeptide présentant au moins 80%, de préférence au moins 85%, et de manière tout à fait préférée au moins 95%

d'identité avec la protéine ZitR de *Lactococcus lactis* (GENBANK AAK06214), placée sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur ;

- au moins un site de restriction permettant l'insertion d'une séquence nucléotidique d'intérêt sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.

5 Selon un mode de réalisation préféré de la présente invention, le promoteur  $p_{zn}$  comprend la séquence suivante :

AAAAATAANGTNNNNNNNTTGACATTATTTTNNNNNNNNNTATAAT  
(SEQ ID NO:2)

dans laquelle TATAAT représente la boîte -10 dudit promoteur.

10 Selon un autre mode de réalisation préféré de la présente invention, ledit promoteur  $p_{zn}$  contient un site de fixation pour la protéine ZitR de *Lactococcus lactis* comprenant la séquence suivante :

AAAAATAAYGTAACTGGTTGACATTATTTT  
(SEQ ID NO:3),

15 dans laquelle Y représente T ou C.

A titre d'exemple de promoteurs  $p_{zn}$  utilisables pour la construction d'une cassette d'expression conforme à l'invention, on citera :

- le promoteur  $p_{zn}$  de la souche MG1363 de *Lactococcus lactis*, qui comprend la séquence :

20 AAAAATAATGTAACTGGTTGACATTATTTTACTTTGCTATATAATTAACCAGTA  
(SEQ ID NO:4) ;

- le promoteur  $p_{zn}$  de la souche IL1403 de *Lactococcus lactis*, qui comprend la séquence :

25 AAAAATAACGTAACTGGTTGACATTATTTTCTTTGCTATATAATTAACCAGTA  
(SEQ ID NO:5)

Selon une seconde variante, la présente invention a pour objet une cassette d'expression constituée par :

- un promoteur bactérien  $p_{zn}$ , tel que défini ci-dessus ;

30 - au moins un site de restriction permettant l'insertion d'une séquence nucléotidique d'intérêt sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.

La présente invention a également pour objet des cassettes d'expression résultant de l'insertion d'une séquence nucléotidique d'intérêt dans une cassette d'expression conforme à la première ou à la seconde variante de l'invention, sous contrôle transcriptionnel du promoteur  $p_{zn}$ .

35 Ladite séquence nucléotidique d'intérêt peut être toute séquence que l'on souhaite exprimer sous contrôle transcriptionnel du promoteur  $p_{zn}$ . Il peut s'agir



notamment de toute séquence codant pour une protéine hétérologue d'intérêt que l'on désire produire dans une bactérie-hôte ; ladite protéine peut le cas échéant être une protéine de fusion, associant des séquences polypeptidiques d'origine diverse.

5 Sont exclues toutefois les cassettes d'expression conformes à la première variante de l'invention et comprenant tout ou partie de la séquence codant pour la protéine ZitS de *L. lactis*, fusionnée à un gène rapporteur.

Des cassettes d'expression conformes à l'invention peuvent, le cas échéant, comprendre en outre les éléments nécessaires pour permettre l'adressage de la protéine d'intérêt à la surface cellulaire, ou sa sécrétion dans le milieu de culture.

10 Dans ce cadre, la présente invention a pour objet des cassettes d'expression résultant de l'insertion d'une séquence nucléotidique codant pour un peptide d'adressage extracellulaire, et d'au moins un site de restriction permettant le clonage d'une séquence nucléotidique d'intérêt en fusion traductionnelle avec ledit peptide d'adressage, sous contrôle transcriptionnel du promoteur  $p_{Zn}$ , dans une cassette  
15 d'expression conforme à l'invention.

Ledit peptide d'adressage peut être par exemple un peptide signal de sécrétion, un domaine transmembranaire, un signal d'ancrage à la paroi, etc.

De nombreux peptides d'adressage utilisables dans le cadre de la présente invention sont connus en eux mêmes. A titre d'exemples non limitatifs, on  
20 citera les peptides décrits dans la publication de POQUET et al. (1998, précité), ou dans la publication de LE LOIR et al. (Appl. Environ. Microbiol., 67, 4119-4127, 2001).

Pour la production de protéines sécrétées, un peptide d'adressage extracellulaire préféré est le peptide signal de la protéine Exp4 de *L. lactis*, qui répond  
25 à la séquence :  
MKKINLALLTLATLMGVSSSTAVVFA (SEQ ID NO: 6).

La présente invention a également pour objet tout vecteur recombinant comprenant un insert constitué par une cassette d'expression conforme à l'invention.

30 La présente invention a également pour objet des bactéries à gram-positif transformées par au moins une cassette d'expression conforme à l'invention.

De préférence, il s'agit de bactéries lactiques, notamment des lactocoques, des lactobacilles ou des streptocoques thermophiles.

Le cas échéant, il peut s'agir de bactéries provenant de souches  
35 bactériennes comportant une ou plusieurs modifications de leur génome, visant à améliorer la production et/ou la sécrétion de protéines exprimées dans lesdites

bactéries, et/ou à éviter leur dégradation. Par exemple, dans le cadre de la production de protéines exportées, on peut utiliser une souche bactérienne dans laquelle l'activité protéasique PrtP et/ou l'activité protéasique HtrA sont inactives, telle que celle décrite dans la Demande PCT WO 00/39309 ou une souche bactérienne surproduisant une protéine permettant de stabiliser les protéines exportées, telle que la protéine Nlp4 de *Lactococcus lactis*, ou un de ses homologues (POQUET et al. 1998, publication précitée).

La présente invention a également pour objet l'utilisation de cassettes d'expression ou de vecteurs recombinants conformes à l'invention pour la production de protéines d'intérêt dans une bactérie à gram-positif, notamment des bactéries lactiques.

Les cassettes d'expression conformes à la première variante de l'invention peuvent être utilisées dans une bactérie-hôte, pour contrôler le moment de l'expression d'un gène d'intérêt inséré dans le site de clonage, et le niveau de cette expression.

Lorsque l'on cultive la bactérie-hôte en présence d'une quantité de zinc en excès par rapport à ses besoins, l'expression du gène d'intérêt est totalement réprimée. La déplétion en  $Zn^{2+}$  du milieu de culture (qui peut s'effectuer simplement par addition d'un agent chélateur des cations divalents, tel que l'EDTA) permet de lever la répression, et de provoquer l'expression du gène. Le niveau d'expression peut être facilement régulé par la quantité d'agent chélateur ajouté.

On peut aussi mettre en culture la bactérie-hôte dans un milieu comprenant une quantité de zinc juste suffisante pour couvrir ses besoins pendant une période donnée de la culture (par exemple pendant la phase de croissance). Dans ce cas, l'épuisement du zinc à l'issue de cette période provoque l'expression du gène d'intérêt.

Dans ce cadre, la présente invention a pour objet un procédé de production d'une protéine d'intérêt dans une bactérie à gram-positif, et notamment une bactérie lactique, caractérisé en ce qu'il comprend :

- l'introduction dans ladite bactérie d'une cassette d'expression conforme à la première variante de l'invention, comprenant une séquence codant pour ladite protéine d'intérêt ;
- la culture de ladite bactérie dans un milieu contenant une quantité de  $Zn^{2+}$  suffisante pour réprimer l'expression de ladite protéine ;
- l'induction de la production de ladite protéine par déplétion en  $Zn^{2+}$  dudit milieu ;

- la récupération de la protéine produite.

Selon un mode de mise en œuvre préféré du procédé conforme à l'invention, la déplétion en  $\text{Zn}^{2+}$  dudit milieu est obtenue par addition d'un chélateur des cations divalents.

5 Selon un autre mode de mise en œuvre préféré de la présente invention, la déplétion en  $\text{Zn}^{2+}$  dudit milieu est obtenue par culture de la bactérie jusqu'à épuisement du  $\text{Zn}^{2+}$  initialement présent dans le milieu.

D'après les expérimentations effectuées par les Inventeurs sur la souche modèle MG1363 de *L. lactis*, le maintien pendant toute la durée de la culture d'une quantité de  $\text{Zn}^{2+}$  suffisante pour réprimer l'expression sous contrôle du système  $p_{\text{zn}}/\text{ZitR}$  peut être assuré par l'utilisation d'un milieu contenant en début de culture, de l'ordre de 1 à 2  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ , le seuil de répression totale pouvant être estimé à entre 100nM et 1  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ . La concentration en  $\text{Zn}^{2+}$  du milieu en dessous de laquelle on obtient la levée complète de la répression de  $p_{\text{zn}}$  est très faible (de l'ordre du nanomolaire, et au maximum de quelques nanomolaires). La quantité de chélateur des cations divalents nécessaire pour effectuer la déplétion en  $\text{Zn}^{2+}$  et induire l'expression sous contrôle du promoteur  $p_{\text{zn}}$  varie selon la quantité de  $\text{Zn}^{2+}$  apportée initialement au milieu de culture ; à titre indicatif, dans le cas de la souche MG1363, pour un milieu de culture riche tel que le milieu M17, une déplétion en  $\text{Zn}^{2+}$  permettant d'induire une expression maximale peut être obtenue à partir d'une concentration d'EDTA de l'ordre de 0,1 mM ; en milieu SA, qui contient 10nM de  $\text{Zn}^{2+}$  une déplétion en  $\text{Zn}^{2+}$  permettant d'induire une expression maximale peut être obtenue à partir d'une concentration d'EDTA de l'ordre de 0,01 mM.

Les quantités de  $\text{Zn}^{2+}$  et d'agent chélateur de cations mentionnées ci-dessus sont données à titre indicatif. A partir de ces indications, et des autres informations fournies par le descriptif de la présente invention, l'homme du métier peut facilement déterminer, par des tests préalables, effectués par exemple en plaçant un gène rapporteur sous contrôle du système  $p_{\text{zn}}/\text{ZitR}$  dans une cassette d'expression conforme à l'invention, les quantités les plus appropriées selon l'espèce ou la souche bactérienne concernée, les conditions opératoires mises en œuvre, telles que le milieu utilisé, les modalités de l'ajout de  $\text{Zn}^{2+}$  et/ou d'agent chélateur (par exemple, en une seule fois, en plusieurs fois, en continu, etc.), et le niveau d'expression souhaité.

Des cassettes d'expression conformes à la seconde variante de l'invention seront utilisées de préférence dans des souches de bactéries, notamment de lactocoques, dans lesquelles le répresseur ZitR endogène est inactif, ainsi qu'éventuellement le complexe ZitSPQ. Dans ces conditions, le promoteur  $p_{\text{zn}}$

constitue un promoteur fort, permettant l'expression de la protéine d'intérêt pendant toute la durée de la culture. L'inactivation du récepteur ZitR et du complexe ZitSPQ peut s'effectuer de manière connue en elle-même, notamment par mutagenèse dirigée de l'opéron *zitRSQP*.

5 Dans ce cadre, la présente invention a pour objet un procédé de production d'une protéine d'intérêt dans une bactérie à gram-positif dans laquelle le répresseur ZitR endogène est inactif, caractérisé en ce qu'il comprend :

- l'introduction dans ladite bactérie d'une cassette d'expression conforme à la seconde variante de l'invention, comprenant une séquence codant pour  
10 ladite protéine d'intérêt ;

- la culture de ladite bactérie ;
- la récupération de la protéine produite.

La présente invention peut être mise en œuvre par exemple :

- dans le domaine de la production de protéines hétérologues  
15 d'intérêt thérapeutique par génie génétique, pour mieux contrôler la production de ces protéines par les cultures de bactéries transformées ;

- en industrie agro-alimentaire, notamment dans la fabrication de produits fermentés, pour contrôler selon le stade de la fermentation, la production de protéines d'intérêt permettant notamment d'influer sur la qualité du produit fermenté  
20 fini.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs, illustrant la construction de cassettes d'expression conformes à l'invention.

#### **EXEMPLE 1 : REGULATION DE ZIT PAR $Zn^{2+}$ CHEZ *L. LACTIS***

25 L'expression de *zit* en fonction de la concentration en  $Zn^{2+}$  du milieu est mesurée par 2 techniques différentes:

\*La mesure de l'activité Nuc de la fusion ZitRS- $\Delta_{Sp}$ Nuc, portée par le plasmide pVE8020, dans la souche de *L. lactis* MG1363. Le plasmide pVE8020 résulte du clonage du fragment d'ADN chromosomique de la souche MG1363  
30 correspondant à  $p_{Zn}zitRzitS'$  (GenBank U95834) dans le plasmide pFUN (POQUET et al., 1998, précité ; GenBank AF038666).

\*La quantification de l'ARNm de *zitS* dans la souche MG1363 sauvage (expression endogène de *zitS*) et dans la souche MG1363 transformée par pVE8020).

35 **Effet du zinc sur l'activité Nuc sous contrôle du promoteur  $p_{Zn}$**

Deux types d'expériences ont été faites :

1). La mesure de l'activité Nuc (nucléase de *Staphylococcus aureus*) a été effectuée sur des boîtes de culture contenant du milieu chimiquement défini SA (JENSEN et HAMMER, *Appl. Env. Microbiol.* 59, 4363-66, 1993), qui comprend une quantité minimale de chacun des éléments nécessaires à la croissance bactérienne, et est notamment pauvre en zinc (10 nM de  $\text{ZnSO}_4$ ).

On effectue sur ce milieu un dépôt d'une solution de  $\text{Zn}^{2+}$  (20  $\mu\text{l}$  de  $\text{ZnSO}_4$  à 0,1M) sous forme d'une strie traversant la boîte.

Après absorption du dépôt de  $\text{Zn}^{2+}$ , on effectue 2 dépôts de bactéries sous forme de 2 stries parallèles entre elles, et coupant perpendiculairement la strie de zinc : un dépôt témoin, (souche MG1363 transformée par un plasmide (pVE8009) portant la fusion  $\text{Usp-}\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$  sous contrôle du promoteur  $\text{Usp}$ ) et un dépôt de la souche MG1363 transformée par pVE8020 (MG1363(pVE8020)).

L'incubation pendant une nuit à 30°C des boîtes permet la croissance des bactéries et la création d'un gradient de concentrations en  $\text{Zn}^{2+}$  décroissantes par diffusion à partir de la strie de  $\text{ZnSO}_4$ .

On réalise un test coloré de l'activité nucléasique, en déposant sur les boîtes une surcouche de détection contenant du bleu de toluidine et en incubant à 37°C (LACHICA et al., *Appl. Microbiol.*, 21, 585-87, 1971; LE LOIR et al., *J. Bacteriol.*, 176, 5135-39, 1994) : l'activité Nuc est détectée par le virage au rose de la surcouche de détection, formant un halo autour des stries de dépôts bactériens.

Alors que le halo observé autour de la strie correspondant au dépôt témoin est de taille et d'intensité constante sur toute la longueur de la strie bactérienne (ce qui indique que ni l'activité nucléasique d' $\text{Usp-}\Delta_{\text{Sp}}\text{Nuc}$ , ni son exportation, ni son expression ne dépendent du  $\text{Zn}^{2+}$ ), celui observé autour de la strie correspondant au dépôt MG1363(pVE8020) est limité à l'extrémité la plus éloignée du dépôt de zinc, où sa largeur et son intensité sont comparables à celles observées pour le dépôt témoin ; l'intensité décroît à l'approche du dépôt de zinc, et on n'observe aucun halo au voisinage de l'intersection avec celui-ci.

Il apparaît donc que des concentrations élevées de zinc répriment l'expression du promoteur de l'opéron *zitRSQP*.

2) La régulation a aussi été étudiée par détection du rapporteur Nuc sur un gel SDS-PAGE grâce à son activité enzymatique (zymogramme). Pour cette expérience, le milieu SA a été encore appauvri en zinc, soit en omettant toute addition de  $\text{ZnSO}_4$  lors de sa préparation, soit en lui ajoutant de l'EDTA à 0,01nM. La souche de *L. lactis* MG1363 (pVE8020) a été inoculée dans ce milieu, puis la culture a été divisée en deux pour subir ou non une addition de 2 $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$ . Après croissance à

30°C sans agitation pendant la nuit, des échantillons de culture ont été prélevés en normalisant leur volume en fonction de leur  $DO_{600}$  de façon à obtenir un nombre de cellules équivalent à celui de 1 ml de culture à  $DO_{600} = 1$ . Les échantillons ont été précipités par l'acide tri-chloroacétique concentré, lavés, lysés en présence de lysozyme et de SDS, et repris dans un tampon de chargement, selon le protocole décrit dans POQUET *et al.* (1998, précité).

Les protéines ont ensuite été séparées selon leur poids moléculaire sur un gel SDS-PAGE à 12,5% d'acrylamide. L'activité Nuc a été détectée comme décrit ci-dessus. Trois formes protéiques présentant une activité nucléasique (qui d'après leur poids moléculaire, correspondent au précurseur au peptide-signal non clivé, à la forme mature Nlp3- $\Delta_{SP}Nuc$ , et au produit de dégradation NucA) ont été détectées uniquement dans l'échantillon de culture n'ayant subi aucune addition. Aucune protéine possédant une activité Nuc n'a été détectée dans l'échantillon supplémenté en  $Zn^{2+}$ . Ces résultats démontrent que la répression est totale en présence de  $2\mu M$  de  $Zn^{2+}$ .

#### Effet de l'EDTA sur l'activité Nuc sous contrôle du promoteur $p_{Zn}$

La mesure de l'activité Nuc est effectuée sur des boîtes de culture contenant du milieu M17 (TERZAGHI and SANDINE, *Appl. Environ. Microbiol.*, 29, 807-13, 1975) riche en zinc.

On effectue un dépôt d'une solution d'EDTA ( $20\mu l$  à  $0,1M$ ), ainsi qu'un dépôt de la souche MG1363 contenant le plasmide témoin, et un dépôt de la souche MG1363( $p_{VE8020}$ ) sous forme de stries, comme décrit ci-dessus.

Après incubation à 30°C pendant une nuit, l'activité Nuc est détectée comme décrit ci-dessus.

Le halo observé autour de la strie correspondant au dépôt témoin est, comme celui observé dans le cas du zinc, de taille et d'intensité constante sur toute la longueur de la strie. En revanche, de façon surprenante, celui observé autour de la strie correspondant au dépôt MG1363( $p_{VE8020}$ ) est, au voisinage du dépôt d'EDTA, beaucoup plus intense que celui du dépôt témoin ; l'intensité décroît très rapidement lorsque l'on s'éloigne de cette intersection.

Il apparaît donc que l'EDTA induit l'expression du promoteur de l'opéron *zitRSQP*. Le niveau d'expression apparaît en outre plus élevé que celui observé à distance de la strie de zinc dans l'expérimentation précédente, et en outre plus élevé que celui du témoin, contrôlé par le promoteur *Usp* : on peut donc atteindre un très fort niveau d'induction de  $p_{Zn}$  *zitR* grâce à des concentrations en EDTA qui n'affectent pas la croissance bactérienne (comme  $0,1mM$  en M17).

**Evaluation quantitative de l'effet de l'EDTA sur l'activité Nuc sous contrôle du promoteur  $p_{zn}$**

Pour évaluer quantitativement l'effet de l'EDTA sur l'activité Nuc exprimée sous contrôle du promoteur de l'opéron *zitRSQP*, les expérimentations suivantes sont effectuées :

La souche MG1363 transformée par pVE8020 est cultivée en milieu M17 supplémenté en érythromycine à 5 µg/l, jusqu'en phase exponentielle ( $DO_{600} = 0,3$ ) ou stationnaire ( $DO_{600} = 1,2$ ). Cette culture est divisée en 4 sous-cultures ; 3 d'entre elles sont alors additionnées d'EDTA à diverses concentrations finales (3,3 mM ; 0,33 mM ; 0,033 mM) ; la quatrième ne reçoit pas d'addition d'EDTA (0 mM EDTA). Après 30 min ou 1h30 d'incubation, des échantillons de chaque culture sont prélevés. Le nombre de cellules de chaque échantillon est normalisé en adaptant le volume de façon à obtenir un nombre de cellules équivalent à celui de 1 ml de culture à  $DO_{600} = 1$ .

Les cellules sont ensuite lysées et précipitées par un traitement à l'acide tri-chloroacétique concentré (16,7%), lavées à l'acétone (80%) et reprises dans 100 µl de tampon Tris (50 mM pH7). 10µl de chaque échantillon ainsi traité sont déposés sur une boîte contenant du milieu de détection de l'activité Nuc (LACHICA et al., 1971 ; LE LOIR et al., 1994, précité). L'activité Nuc est évaluée par la taille du halo et l'intensité de la coloration rose autour de chaque dépôt. Pour une évaluation quantitative du niveau d'activité, on dépose sur la même boîte une gamme étalon de protéine Nuc purifiée (dilution de 4 en 4 à partir de 400 ng).

On constate que la taille du halo et l'intensité de la coloration varient en fonction de la concentration en EDTA qui a été utilisée pour traiter les cellules. En l'absence d'EDTA, on observe un halo très fin sans coloration nette ; à 0,033 mM d'EDTA, on observe un fin halo, nettement coloré en rose ; à 0,33 mM, on observe un halo large, de coloration rose très intense. On n'observe aucune augmentation de la taille et de l'intensité du halo de 0,33 à 3,3 mM. Aucune différence significative de la taille et de l'intensité du halo n'est notée entre l'addition d'EDTA effectuée en phase exponentielle et celle effectuée en phase stationnaire, ni entre les deux temps d'incubation (30 mn ou 1h 30).

Ces résultats indiquent que le niveau d'induction de l'expression de  $p_{zn}$  augmente avec la concentration en EDTA ajoutée, jusqu'à un seuil de saturation (qui est atteint en milieu M17, dans les conditions expérimentales décrites ici, pour une concentration en EDTA de l'ordre de 0,33 mM, quelle que soit la phase de croissance et le temps d'incubation).

La comparaison avec la gamme étalon de protéine Nuc purifiée permet d'estimer que le niveau d'induction obtenu par addition de 0,33 mM d'EDTA en milieu M17 est de l'ordre de 100.

### Effet du zinc sur la transcription de l'opéron *zit*

5 Les souches utilisées sont la souche sauvage de *L. lactis* subsp *cremoris* MG1363, et sa dérivée mutante FNR (double mutant *flpA flpB*, SCOTT et al., 2000, précité ; GOSTICK et al., 1999, précité). Les gènes *flp* sont des régulateurs pléiotropes intervenant notamment dans le transport du zinc : chez FNR, la concentration intracellulaire en zinc est sept à huit fois plus faible que celle de la  
10 souche sauvage (GOSTICK et al., 1999, précité).

A partir d'une préculture d'une nuit de chaque souche en milieu SA supplémenté pour FNR uniquement, en érythromycine à 5 µg/µl et en tétracycline à 5 µg/µl, on effectue une culture à 30°C en milieu SA (dont la concentration en  $Zn^{2+}$  est de 10nM). En phase exponentielle précoce ( $DO_{600}$  0,07 à 0,08), cette culture est  
15 divisée en deux parties : l'une (+) est additionnée de  $ZnSO_4$  pour obtenir une concentration finale en  $Zn^{2+}$  de 2 µM (qui n'affecte pas la croissance) ; l'autre (-) ne reçoit aucune addition. La culture est poursuivie sans modification jusqu'en phase exponentielle ( $DO_{600} = 0,2$ ) ou stationnaire ( $DO_{600} = 0,8$ ). L'ARN des bactéries est alors extrait selon le protocole décrit par RAYA et al., (*J. Bacteriol.*, 180, 3174-80,  
20 1998).

Après l'extraction, la concentration en ARN est évaluée par mesure de la  $DO_{260}$  : 60 µg d'ARN sont déposés sur un gel à 1% d'agarose. Après migration et transfert sur une membrane de nylon, les transcrits *zitRS* sont détectés par transfert de Northern, avec une sonde spécifique du gène *zitS*.

25 Les résultats sont illustrés par la Figure 1.

Ces résultats montrent que l'on n'observe un ARNm spécifique de la taille attendue pour *zitRS* qu'en l'absence (-) d'addition de  $Zn^{2+}$  et jamais en sa présence (+) quelle que soit la souche, et quelle que soit la phase de croissance au moment de l'addition.

30 Cela montre 1) que la répression par le  $Zn^{2+}$  de l'expression de l'opéron *zit* s'effectue au niveau transcriptionnel, 2) qu'elle est totale pour une concentration en  $Zn^{2+}$  du milieu de 2µM, et 3) qu'elle est indépendante des gènes *flp*, puisqu'elle s'exerce dans le mutant FNR. Ce dernier point indique que la régulation par le  $Zn^{2+}$  dépend entièrement du régulateur *zitR*.

35 En absence d'addition de  $Zn^{2+}$ , on observe un niveau d'expression très fort, sauf pour la souche MG1363 en phase exponentielle, où l'on observe qu'une



faible expression. Ces résultats indiquent que malgré la très faible concentration en  $Zn^{2+}$  (10 nM) du milieu SA de départ, la concentration intracellulaire en  $Zn^{2+}$  au moment de la phase exponentielle où a été effectué le prélèvement est encore suffisante, dans le cas de la souche MG1363, pour réprimer fortement la transcription de l'opéron *zit*. En revanche, en phase stationnaire, après épuisement du  $Zn^{2+}$  présent dans le milieu, l'expression est très forte. Dans le cas de la souche FNR, la concentration en  $Zn^{2+}$  de 10 nM du milieu de départ est insuffisante pour assurer, même pendant la phase exponentielle, une concentration en  $Zn^{2+}$  intracellulaire réprimant la transcription de l'opéron *zit*.

Il apparaît donc que l'induction de l'expression dépend directement de la concentration intracellulaire en  $Zn^{2+}$ , et que celle-ci doit être très faible pour obtenir une expression maximale.

Ceci peut être obtenu notamment :

1) En abaissant la concentration extra-cellulaire en  $Zn^{2+}$  ; celle-ci doit en effet être très inférieure à 10nM, où l'on observe encore une répression importante par rapport au niveau d'induction maximal. L'abaissement de la concentration extra-cellulaire en  $Zn^{2+}$  peut par exemple s'effectuer par l'addition d'un agent chélateur comme l'EDTA (quelle que soit la phase de croissance), ou en opérant en phase stationnaire, dans des conditions où le  $Zn^{2+}$  initialement présent dans le milieu a été consommé par les bactéries au cours de la croissance, ou par une combinaison de ces deux moyens.

2) En utilisant des mutants dans lesquels le transport du zinc est affecté, et qui possèdent de ce fait une concentration en  $Zn^{2+}$  intra-cellulaire très faible, tels que la souche FNR mentionnée ci-dessus.

## EXEMPLE 2 : CONSTRUCTION DE VECTEURS D'EXPRESSION SOUS CONTROLE DU SYSTEME DE REGULATION DE L'OPERON ZITRSQP

### Construction de plasmides contenant le système de régulation de l'opéron *zitRSQP*

#### Plasmide pDI11

Le système promoteur-régulateur  $p_{Zn-zitR}$  de la souche MG1363 est obtenu par amplification PCR (kit DyNAzyme EXT de FINNZYMES) d'une partie de l'insert  $p_{Zn-zitRzitS'}$  (GenBank U95834) du plasmide pVE8020 avec les oligonucléotides oligo 9 et oligo MUT :

Oligo 9 :

5' -CTAATGAGCGGGCTTTTT-3' (SEQ ID NO: 7)

Oligo MUT :

5' -GCTCTAGAGCGGGATCCTTCATCGAACTCTTCAG-3' (SEQ ID NO: 8)

Oligo 9 s'hybride avec le site de clonage multiple (MCS) de pFUN, et permet d'amplifier tout insert cloné dans ce vecteur. Oligo MUT permet d'éliminer le site de fixation potentiel des ribosomes (RBS) de *zitS* et pour faciliter le clonage du fragment PCR : sa séquence, située dans la zone de chevauchement entre *zitR* et *zitS*, présente deux mutations (soulignées) dans le RBS (la séquence sauvage 5'-GGAGGGAG-3' est mutée en 5'-TGAAGAG-3', complémentaire de 5'-CTCTTCA-3' dans l'oligo MUT) et les deux sites de restriction *Bam*HI et *Xba*I (en gras).

La séquence de la région du plasmide pVE8020 à partir de laquelle est effectuée l'amplification (SEQ ID NO: 9) est représentée sur la Figure 2. Les chiffres à gauche de la séquence correspondent à la numérotation de la séquence entière du plasmide pVE8020. Les zones d'appariement des amorces oligo 9 et oligo MUT sont représentées en gras et avec des flèches. Les séquences codant pour *ZitR* et une partie de *ZitS* sont indiquées. Les RBS (sites de fixation des ribosomes) potentiels de *zitR* et *zitS* sont encadrés, et les codons d'initiation de la traduction ATG sont soulignés. Les boîtes -35 et -10 du promoteur sont encadrées et surlignées en gris ; le site potentiel d'initiation de la transcription est indiqué par un soulignement double.

Le produit d'amplification de 700 pb est traité par le fragment Klenow (PolIK) de l'ADN polymérase d'*Escherichia coli*, puis par *Xba*I. Ce fragment modifié est purifié et cloné dans le vecteur pFUN, préalablement digéré par *Eco*RV et *Xba*I : le mélange de ligation (fragment + pFUN + ligase du phage T4) est utilisé pour électroporer la souche MG1363 de *Lactococcus lactis*, et des clones résistant à l'érythromycine sont sélectionnés sur milieu solide M17 + glucose 0,5% + érythromycine 5 µg/mL. Un de ces clones, contenant un plasmide recombinant de 8,2 kb, dénommé ci-après pDI11, est choisi.

Les étapes de la construction de ce plasmide sont représentées sur la Figure 3a.

Il contient la totalité de la séquence codant pour *ZitR*, ainsi qu'une séquence 5' comprenant le promoteur *p<sub>zn</sub>*. Cette séquence 5' (SEQ ID NO:10) est représentée ci-après (jusqu'au site potentiel d'initiation de la transcription):

GATCTGTCAGCTGGTTCAACTAGCGGTGGTCAAACCTGTTAGTAATAAACTTATTGT  
TTTGATGTTTCGGCTTAAGGATGGAAGGATTTTCAAATAAAAAAGTAAAAAATAATG  
TTAACTGGTTGACATTATTTTACTTTGCTATATAATTAACCGTA

#### Plasmide pDI12

pDI11 est digéré par *Eco*RI et *Eco*RV et traité par PolIK pour obtenir un fragment linéaire de 8,18 kb dépourvu des sites de restriction du MCS de

pFUN (ce qui permet de les introduire ultérieurement ailleurs dans la construction), puis traité par la ligase du phage T4. La souche MG1363 est électroporée par le mélange de ligation, et un clone résistant à l'érythromycine et contenant le plasmide pDI12 est sélectionné comme décrit ci-dessus.

5 Les étapes de la construction de ce plasmide sont représentées sur la Figure 3b.

**Construction de plasmides contenant un gène rapporteur sous contrôle du système de régulation de l'opéron *zitRSOP***

**Plasmide pDI24**

10 pDI24 comprend les éléments suivants : une séquence codant pour une protéine rapporteur permettant de tester le système, suivie par un terminateur.

La protéine rapporteur choisie est NucB, la forme dépourvue de peptide signal de la nucléase Nuc de *Staphylococcus aureus* (SHORTLE, Gene, 22, 181-189, 1983). Son cadre ouvert de lecture est cloné dans le plasmide pSEC1 (ou  
15 pVE3684, CHATEL *et al*, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 8, 545-551, 2001) sous le contrôle du promoteur  $p_{nis}$  (inductible par la nisine) pour la transcription, et des signaux d'Usp45 de *L. lactis* pour la traduction (RBSUsp45 et codon d'initiation) et la sécrétion (peptide signal PSUsp45) : l'ensemble  $p_{nis}$ -RBSUsp45-PSUsp45 est cloné dans pDI24.

20 Le terminateur choisi est le terminateur T1T2 (PESCHKE *et al*, J. Mol. Biol., 186, 547-555, 1985) qui provient du plasmide pVE5239 (DIEYE *et al*, J. Bacteriol., 183, 4157-4166, 2001).

Pour la construction de pDI24, pSEC1 est digéré par *Xho*I, traité par l'ADN polymérase du phage T4, et digéré par *Cla*I, pour obtenir une forme linéaire de  
25 3,8 kb. En parallèle, pVE5239 est digéré par *Sac*I, traité par l'ADN polymérase du phage T4, et digéré par *Cla*I, pour obtenir un fragment de 217 pb contenant le terminateur T1T2. Ce fragment est purifié et ligaturé avec la forme linéaire du vecteur pSEC1, et le mélange de ligation est utilisé pour transformer la souche TG1 d'*E. coli*. Des clones résistant au chloramphénicol sont sélectionnés sur boîtes LBT +  
30 chloramphénicol 12,5 µg/mL. Un de ces clones, contenant un plasmide de 4 kb dénommé pDI24, est choisi.

Les étapes de la construction de pDI24 sont représentées sur la Figure 4.

### Plasmide pDI1224

La fusion PSUsp45-NucB est placée sous le contrôle du système d'expression  $p_{Zn-zitR}$  dans le plasmide pDI12, pour produire le plasmide pDI1224.

pDI12 est digéré par *Xba*I, traité par l'ADN polymérase du phage T4, puis digéré par *Bam*HI, pour obtenir une forme linéaire de 8,1 kb. En parallèle, pDI24 est digéré par *Sac*II, traité par l'ADN polymérase du phage T4, et digéré par *Bam*HI, pour obtenir un fragment de 932 pb contenant le cadre ouvert de lecture de la protéine rapporteur NucB (sous le contrôle de RBSUsp45 et de PSUsp45), et le terminateur de transcription T1T2. Ce fragment de 932 pb est purifié et ligaturé avec la forme linéaire du vecteur pDI12, et le produit de ligation utilisé pour transformer MG1363. Les transformants sont sélectionnés sur du milieu solide M17 + glucose 0,5%, + érythromycine 5 µg/mL + EDTA 0,2 mM. L'EDTA permet d'induire, grâce au système  $p_{Zn-zitR}$ , l'expression du rapporteur, et donc d'effectuer un premier crible du phénotype Nuc<sup>+</sup> des clones recombinants. Le test d'activité Nuc est effectué selon le protocole décrit par LE LOIR *et al*, (J. Bacteriol. 176, 5135-5139, 1994).

Les étapes de construction de pDI1224 sont représentées sur la Figure 5.

L'insert de ce plasmide contenant le gène rapporteur codant pour NucB, sous contrôle du système d'expression  $p_{Zn-zitR}$ , est schématisé sur la Figure 6a.

### Plasmide pDI30

Pour quantifier le niveau d'expression contrôlée par  $p_{Zn-zitR}$  en fonction des conditions environnementales en  $Zn^{2+}$ , un autre rapporteur de localisation cytoplasmique a été utilisé : la  $\beta$ -galactosidase de *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, codée par l'opéron *lacLM*.

L'opéron *lacLM* a été amplifié par PCR à partir du plasmide pAMJ769 (MADSEN *et al*, Mol. Microbiol. 32, 75-87, 1999), en utilisant le couple d'amorces suivant :

LAC5 :

5'-CGCGGATCCTTTGAAAGGATATTCCTC-3' (SEQ ID NO : 15)

LAC3 :

5'-CCTACGTATTAGAAATGAATGTTAAAGC-3' (SEQ ID NO : 16).

Les amorces LAC5 et LAC3 ont été respectivement dessinées d'après la séquence du plasmide pAK80, publiée par ISRAELEN *et al*, (Appl. Environ. Microbiol. 61, 2540-2547, 1995) et d'après la séquence des gènes *lacLM* disponible sur GeneBank sous le numéro M92281. LAC5 chevauche le site potentiel de fixation du ribosome de *lacL* (RBS, indiqué en gras sur la séquence), et LAC3

contient le codon stop de *lacM*. De plus, pour permettre le clonage du fragment PCR, on a introduit les sites de restriction *Bam*HI et *Sna*BI aux extrémités de LAC5 et LAC3 respectivement (soulignés sur les séquences). Pour la construction de pDI30, le plasmide récepteur pDI1224 a été digéré par *Bam*HI et *Eco*RV pour déléter le rapporteur sécrété PSusp45NucB, et le produit de PCR *lacLM*, après digestion par *Bam*HI et *Sna*BI, a été inséré à sa place. Ce mélange de ligation a été utilisé pour transformer la souche de *L. lactis* MG1363. Les transformants ont été sélectionnés en milieu gelosé M17+ glucose 0,5% + érythromycine 5µg/mL + X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) 160 µg/ml + EDTA 0,5 mM. L'addition de X-Gal et d'EDTA au milieu permet de cribler les clones qui portent pDI30 pour leur phénotype bleu, lié à l'hydrolyse du X-Gal par la β-galactosidase (il a été vérifié qu'en absence d'EDTA, les clones restent blancs, ce qui indique que le milieu contient suffisamment du Zn<sup>2+</sup> pour fermer l'expression de LacLM).

L'insert de ce plasmide contenant l'opéron *lacLM* codant pour la β-galactosidase, sous contrôle du système d'expression p<sub>Zn</sub>-zitR, est schématisé sur la Figure 6b.

Les étapes de la construction de pDI30 sont représentées sur la Figure 7.

### 20    **EXEMPLE 3 : QUANTIFICATION DU NIVEAU D'INDUCTION D'UN GENE RAPPORTEUR DE LOCALISATION CYTOPLAMIQUE SOUS CONTROLE DU PROMOTEUR P<sub>ZN</sub>ZITR**

La souche de *L. lactis* MG1363 portant le plasmide pDI30 a été cultivée en milieu chimiquement défini SA, supplémenté en Zn<sup>2+</sup> à 1 µM. La croissance a été effectuée pendant une nuit à 30°C sans agitation.

Le lendemain, la culture a été diluée à environ 1/100ième dans du milieu SA (qui contient du ZnSO<sub>4</sub> à la concentration de 10 nM) et la croissance a été suivie par mesure de la DO<sub>600</sub>. A la valeur de DO<sub>600</sub>~0,2, la culture a été divisée en plusieurs sous-cultures soumises à différents traitements : aucune addition ou addition d'EDTA aux concentrations de 10 – 30 – 50 – 100 – 300 ou 500 µM ou encore addition de Zn<sup>2+</sup> à la concentration de 1 µM. A différents temps de traitement, la croissance a été suivie par mesure de la DO<sub>600</sub>, et l'activité β-galactosidase (β-Gal) des extraits bactériens a été quantifiée par la méthode de Miller. En présence d'ONPG, la β-Gal produit du *O*-nitrophénol de couleur jaune que l'on peut doser par mesure de la densité optique à 420 nm ; 1 unité Miller d'activité β-Gal est définie comme

produisant 1 nmol de *O*-nitrophenol par minute par unité de densité optique par mL de culture.

L'activité  $\beta$ -Gal mesurée après 1h de traitement en fonction de la concentration en EDTA rajoutée (exprimée en  $\mu$ M) est représentée sur la Figure 8a ; la sous-culture supplémentée en  $\text{Zn}^{2+}$  à 1  $\mu$ M est repérée par une flèche (+1  $\mu$ M Zn)

En absence d'EDTA ou en présence de  $\text{Zn}^{2+}$ , on observe un niveau d'activité  $\beta$ -Gal de base très faible. En présence d'EDTA, on observe une induction très nette de l'activité  $\beta$ -Gal qui dépend de la concentration en EDTA : le niveau d'activité maximum (induction d'un facteur >100) est obtenu pour les concentrations de 30  $\mu$ M ou 50  $\mu$ M d'EDTA, ce qui définit donc la gamme de concentrations optimale à utiliser dans ces conditions pour avoir une induction maximale.

Au cours de la même expérience, la croissance (courbes en pointillés) et l'activité  $\beta$ -Gal (courbes en traits pleins) de certaines sous-cultures ont aussi été mesurées en fonction du temps ; les résultats sont représentés sur la Figure 8b. Les sous-cultures étudiées ont subi, à la  $\text{DO}_{600} \sim 0,2$  (repérée par une flèche), les traitements suivants : aucune addition ( $\square$ ) ; addition d'EDTA à 30  $\mu$ M ( $\Delta$ ) ou 50  $\mu$ M ( $\diamond$ ) ; addition de  $\text{Zn}^{2+}$  à 1  $\mu$ M (O). A des intervalles de temps réguliers après ces traitements, des aliquotes sont prélevés pour quantifier l'activité  $\beta$ -Gal des cellules bactériennes. Le niveau d'induction dépend à la fois du temps d'exposition à l'EDTA et de sa concentration. L'induction maximale est d'un facteur >500 pour 3 à 4h en présence d'EDTA 30  $\mu$ M, ce qui permet de définir les conditions d'utilisation du système.

#### EXEMPLE 4 : CONSTRUCTION DE PLASMIDES CONTENANT UNE SEQUENCE CODANT POUR UN PEPTIDE SIGNAL DE SECRETION

Ces plasmides sont construits par substitution d'éléments du système de sécrétion PSUsp45 du plasmide pSEC par ceux du système de sécrétion d'Exp4.

La séquence codant le peptide signal d'Exp4 (PSExp4), accompagnée des signaux de traduction d'Exp4, c'est-à-dire son RBS (ou RBSExp4) et son codon d'initiation de la traduction, a été amplifiée à partir du plasmide pVE8022 (POQUET *et al*, 1998 précité), en utilisant les couples d'amorces Exp4-5 + Exp4-NdeI et M13reverse + Exp4-NdeI, dont les séquences sont :

M13reverse :

5' -CAGGAAACAGCTATGACC-3' (SEQ ID NO: 11) ;

Exp4-5 :

5' -GTTCTAAGGATCCATTAAGGAG-3' (SEQ ID NO: 12) ;

Exp4-NdeI :

5' -TTTGTGATGCATATGCAAATACAACGGCTGTTG-3' (SEQ ID NO: 13);

Les amorces Exp4-5 et Exp4-NdeI ont été dessinées à partir de la partie 5' du gène *exp4* de la souche MG1363 de *L. lactis* (GENBANK numéro U95836).

5 Dans Exp4-5 et Exp4-NdeI, on a introduit des sites de restriction (en gras) aux extrémités de PSExp4 pour faciliter son clonage, respectivement *Bam*HI en 5' et *Nsi*I en 3' (en aval du site de clivage potentiel de PSExp4). Le site *Nsi*I est introduit à une position qui permet le clonage de PSExp4 en phase avec NucB.

Par ailleurs, Exp4-NdeI comprend un site *Nde*I (souligné) pour  
10 permettre un clonage éventuel (d'une protéine d'intérêt) en phase avec PSExp4. L'insertion des sites *Nde*I et *Nsi*I n'introduit que deux acides aminés à l'extrémité N-terminale de NucB : Tyr (codé par TAT dans Exp4-NdeI) et Ala (GCA dans Exp4-NdeI), ce qui perturbe peu la séquence.

L'amplification par Exp4-5 + Exp4-NdeI à partir de l'ADN du  
15 plasmide pVE8022 produit un fragment de 117 pb.

Le peptide codé par ce fragment répond à la séquence MKKINLALLTLATLMGVSSSTAVVFA↓YA (SEQ ID NO:14) qui correspond à la séquence du peptide signal d'Exp4, jusqu'au site prédit de clivage (indiqué par une flèche) suivi des deux acides aminés Y et A insérés en amont de NucB.

20 Après digestion par *Bam*HI et *Nsi*I le fragment Exp4-5 + Exp4-NdeI de 117 pb est inséré par ligation dans pSEC1 (CHATEL *et al*, 2001 précité) digéré par les mêmes enzymes, ce qui permet la substitution de PSUsp45 par PSExp4.

L'amplification PCR par M13reverse + Exp4-NdeI à partir de l'ADN du plasmide pVE8022 produit un fragment de 799 pb. Ce fragment contient les  
25 signaux de transcription, de traduction et de sécrétion de Exp4.

Après digestion par *Eco*RV et *Nsi*I, ce fragment est inséré dans pSEC1 préalablement digéré par *Xba*I traité par la polymérase du phage T4 et digéré par *Nsi*I. Dans le plasmide résultant, la production et la sécrétion de NucB sont ainsi placées sous contrôle des signaux de transcription, de traduction et de sécrétion de  
30 Exp4.

## REVENDEICATIONS

### 1) Cassette d'expression constituée par :

- un promoteur bactérien, dénommé ci-après  $p_{zn}$ , contenant un site de fixation pour la protéine ZitR de *Lactococcus lactis*, lequel site comprend la séquence suivante :

AAAAATAANGTNNNNNNNTTGACATTATTTT

(SEQ ID NO:1),

dans laquelle TTGACA représente la boîte -35 dudit promoteur, et N représente A, C, G, ou T ;

- une séquence codant pour un polypeptide présentant au moins 80% d'identité avec la protéine ZitR de *Lactococcus lactis*, placée sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur ;

- au moins un site de restriction permettant l'insertion d'une séquence nucléotidique d'intérêt sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.

### 2) Cassette d'expression selon la revendication 1, caractérisée en ce que le promoteur $p_{zn}$ comprend la séquence suivante :

AAAAATAANGTNNNNNNNTTGACATTATTTTNNNNNNNNNTATAAT

(SEQ ID NO:2),

dans laquelle TATAAT représente la boîte -10 dudit promoteur.

### 3) Cassette d'expression selon la revendication 2, caractérisée en ce que le promoteur $p_{zn}$ comprend une séquence choisie parmi :

- la séquence :

AAAAATAATGTAACTGGTTGACATTATTTTACTTTGCTATATAATTAACCAGTA

(SEQ ID NO:4) ;

- la séquence :

AAAAATAACGTAACTGGTTGACATTATTTTCTTTGCTATATAATTAACCAGTA

(SEQ ID NO:5)

### 4) Cassette d'expression constituée par :

- un promoteur bactérien  $p_{zn}$ , tel que défini dans les revendications 1 à 3 ;

- au moins un site de restriction permettant l'insertion d'une séquence nucléotidique d'intérêt sous contrôle transcriptionnel dudit promoteur.

### 5) Cassette d'expression résultant de l'insertion d'une séquence nucléotidique codant pour un peptide d'adressage extracellulaire, et d'au moins un site de restriction permettant le clonage d'une séquence nucléotidique d'intérêt en fusion traductionnelle avec ledit peptide d'adressage, sous contrôle transcriptionnel du



promoteur  $p_{zn}$ , dans une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 4.

6) Cassette d'expression selon la revendication 5, caractérisée en ce que ledit peptide d'adressage extracellulaire est un peptide signal de séquence : MKKINLALLTLATLMGVSS TAVVFA (SEQ ID NO: 6).

7) Cassette d'expression résultant de l'insertion d'une séquence nucléotidique d'intérêt sous contrôle transcriptionnel du promoteur  $p_{zn}$ , dans une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 6, à l'exclusion des cassettes d'expression comprenant tout ou partie de la séquence codant pour la protéine ZitS de *L. lactis*, fusionnée à un gène rapporteur.

8) Vecteur recombinant comprenant un insert constitué par une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 7.

9) Bactérie à gram-positif transformée par au moins une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 7.

10) Bactérie selon la revendication 9, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une bactérie lactique.

11) Utilisation d'une cassette d'expression selon une quelconque des revendications 1 à 7, ou d'un vecteur recombinant selon la revendication 8, pour la production d'une protéine d'intérêt dans une bactérie à gram-positif.

***This Page Blank (uspto)***

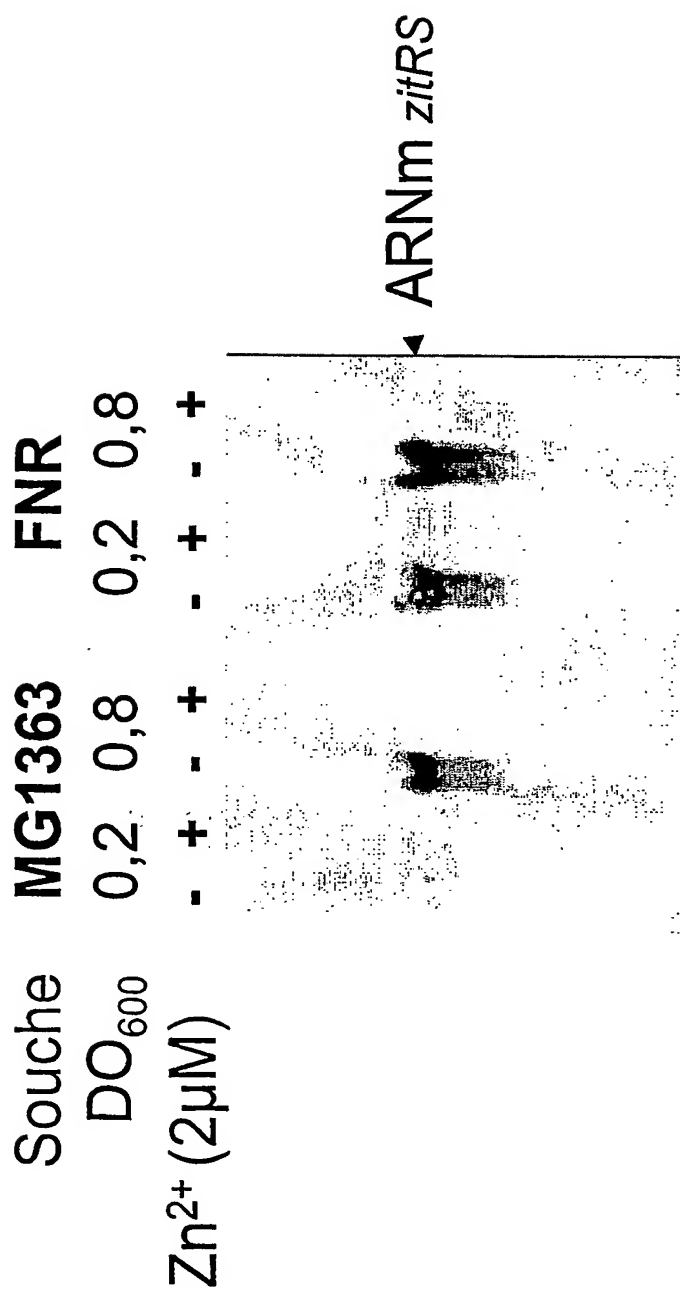


FIG. 1

**This Page Blank (uspto)**

```

7371 cacaggaaac agctatgacc atgattacgc caagctcgaa attaacccctc actaaaggga acaaaagctg ggtaccgggc cccccctcga ggtcgacggt atcgatagcc
7481 cgccataatga gcgggctttt ttttgatatc gaattacccg ggaattcaga tctttgatca aggatctgtc agctgggttc actaggggtg gtcaaacgtg tagtaataaa

      OLIGO 9
7591 acttattgtt ttgatgttcg gcttaaggat ggaaggattt ttcaataaaa aaagtataaa ctggttgaca ttatttttac ttgcta[cat aat]taaccag
7701 taaactaatt at[ggagg]ca aaatactatg antttagcaa atcaaatcga ccagtttctt ggggcaatta tgcagtttgc anaaacaag catgaaatat tactoggcga
>>..... zitr .....>
7811 atgnaaaagt aatgttaagc taacaagcac gcaagaacat atctaatga ttctagctgc agaggtttcg acaaacgcga gaattgccga gcaactcaag atttcgccag
>..... zitr .....>
7921 cagcggtaac taaagctctc aaaaaattac aagagcaaga actgattaaa tcaagtcggg caacaaatga cgaacgcgtg gtcccttggg gactgacaga aaaagcaatt
>..... zitr .....>
8031 ccagttgcta aagaacatgc tgctcatcat gaaaaactc taagtacctc ccaagaatta ggagacaaat ttactgacga agaaaaaaa gtgataagtc aattcttacc
>..... zitr .....>
8141 agtacttacy gaggagtttc gatgaagaaa atattgatgt tatttgctat tccggcagtt ttacttcttg ctggttgta aaaaacagca gaaaaaccag aagttgtgac
>>..... zits .....>
>..... zitr .....>>

      OLIGO MUT
8251 aacttttgag ccgatgtatg aatttagaa agcgattgtt ggagataagg ttaaaattga aaatattgtt ccggcgaatc aagaagttca cgaatttgaa ccgagtgcca
>..... zits .....>
8361 ttacgaaaaa aatgtagaa aatgcaaga aaattgaagt cgagtttgac aaagttcaaa gaactgataa atatggacgt ggcttagcgt atatttatgc tgatggaaaa
>..... zits .....>

```

FIG. 2

**This Page Blank (uspto)**

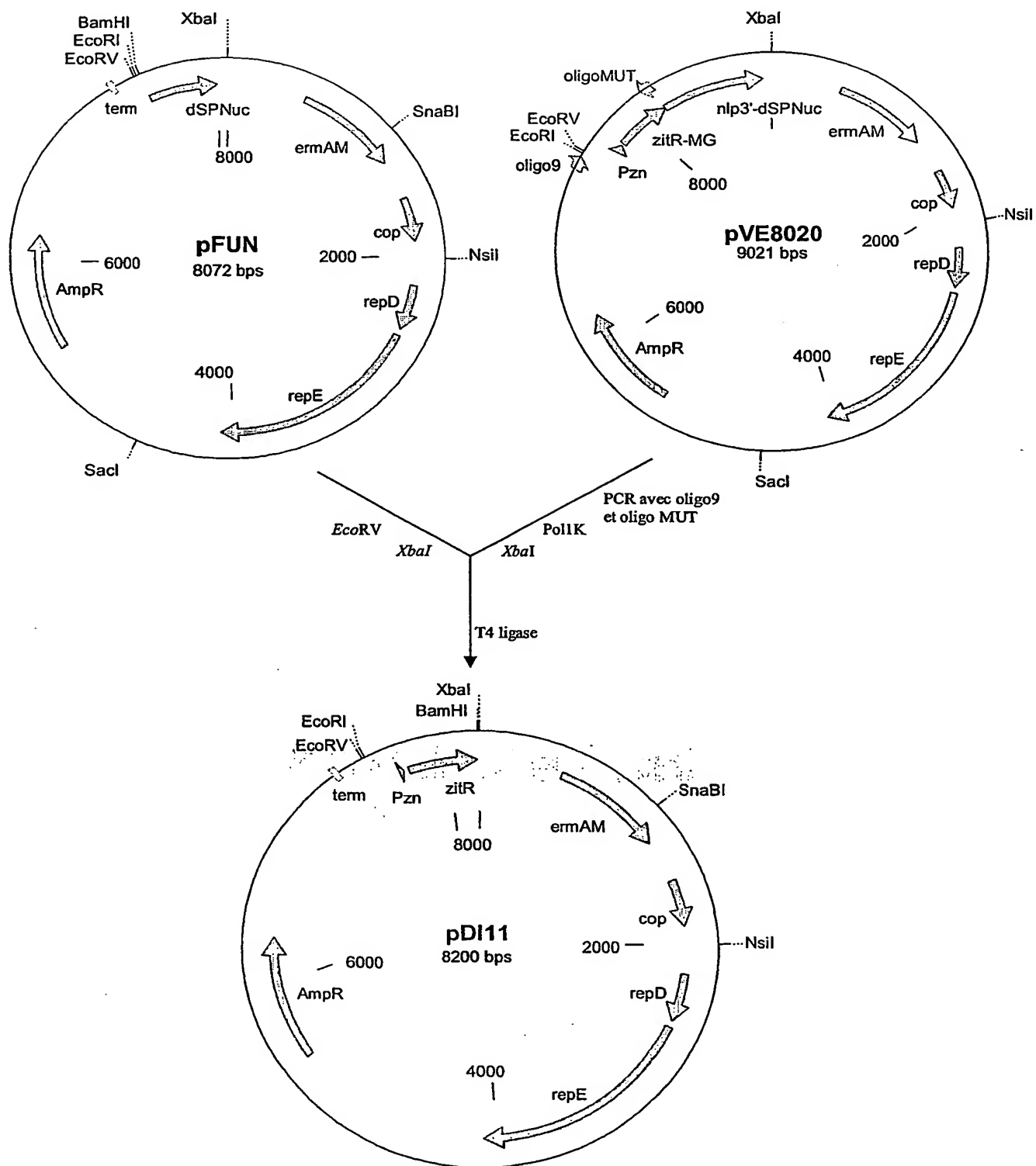


FIG. 3a

**This Page Blank (uspto)**



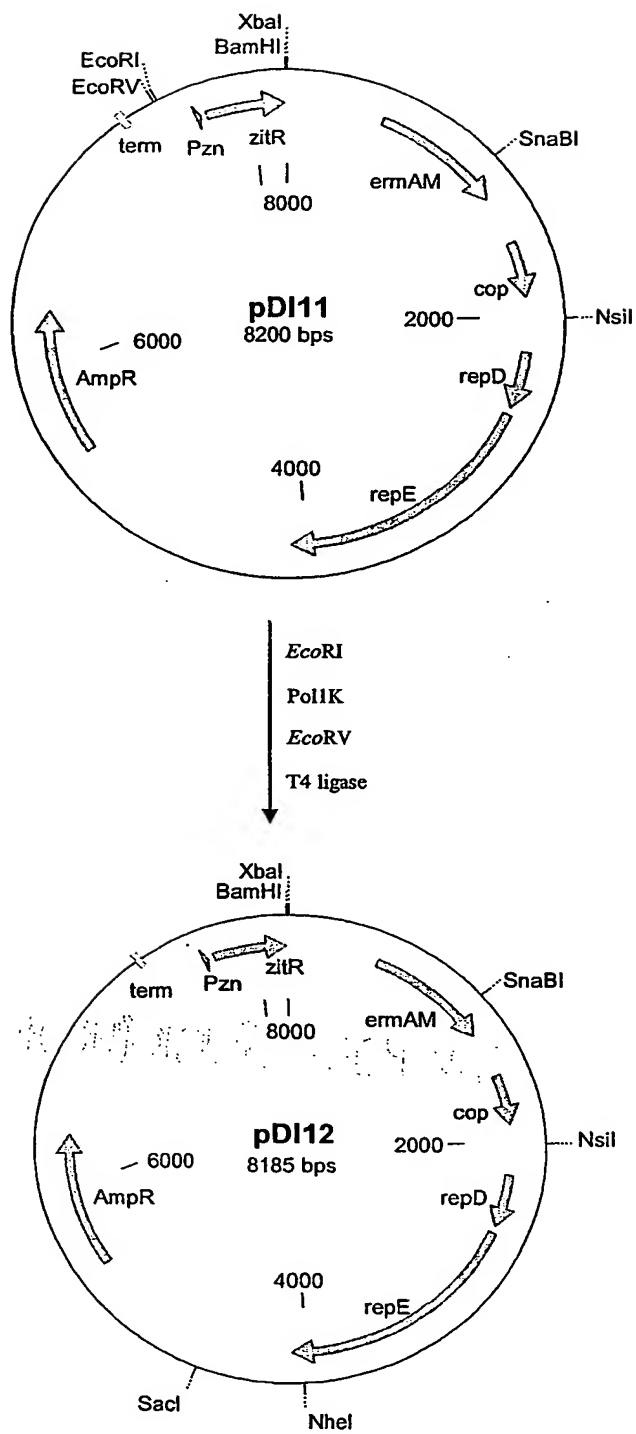


FIG. 3b

**This Page Blank (uspto)**

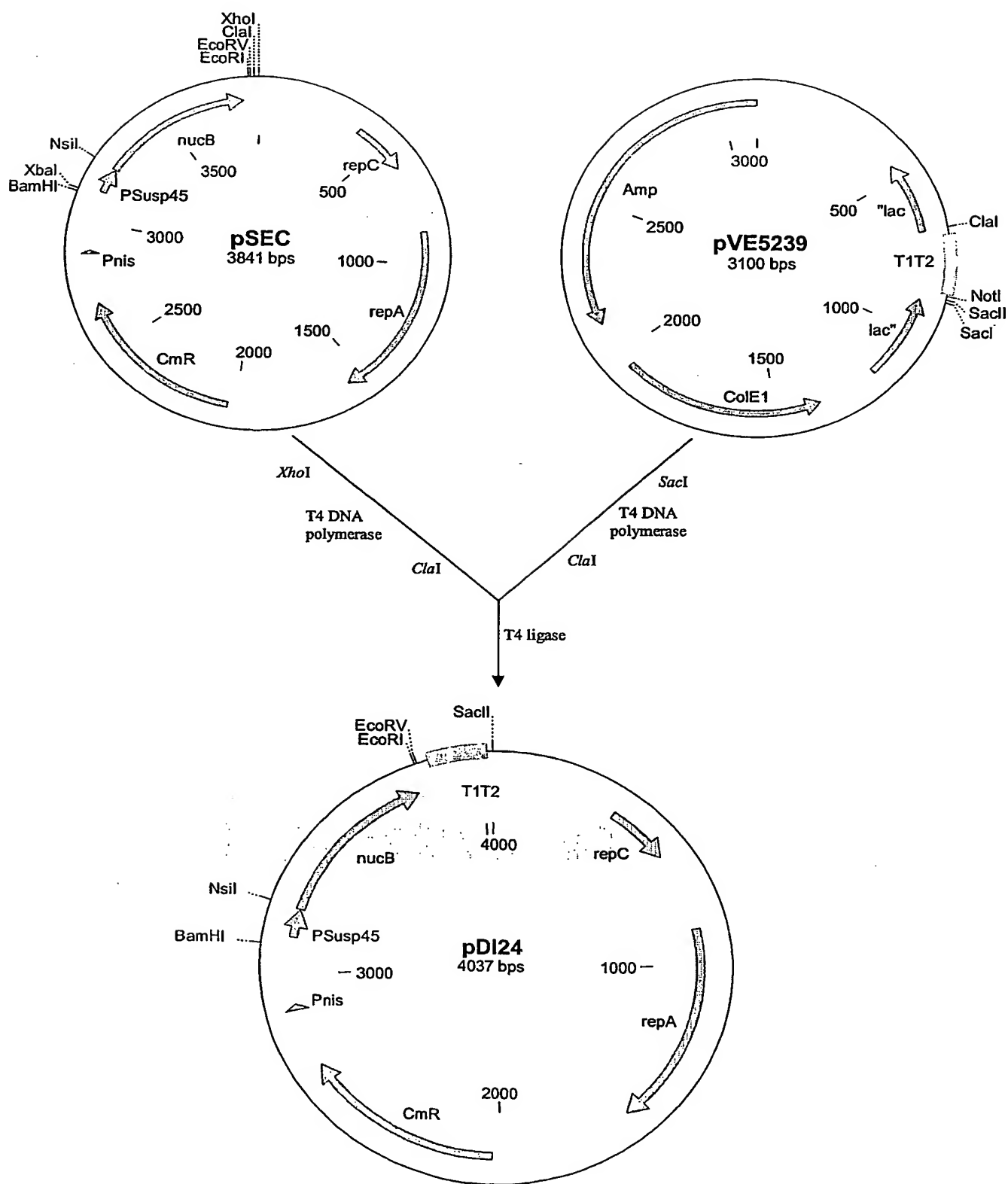


FIG. 4

**This Page Blank (uspto)**

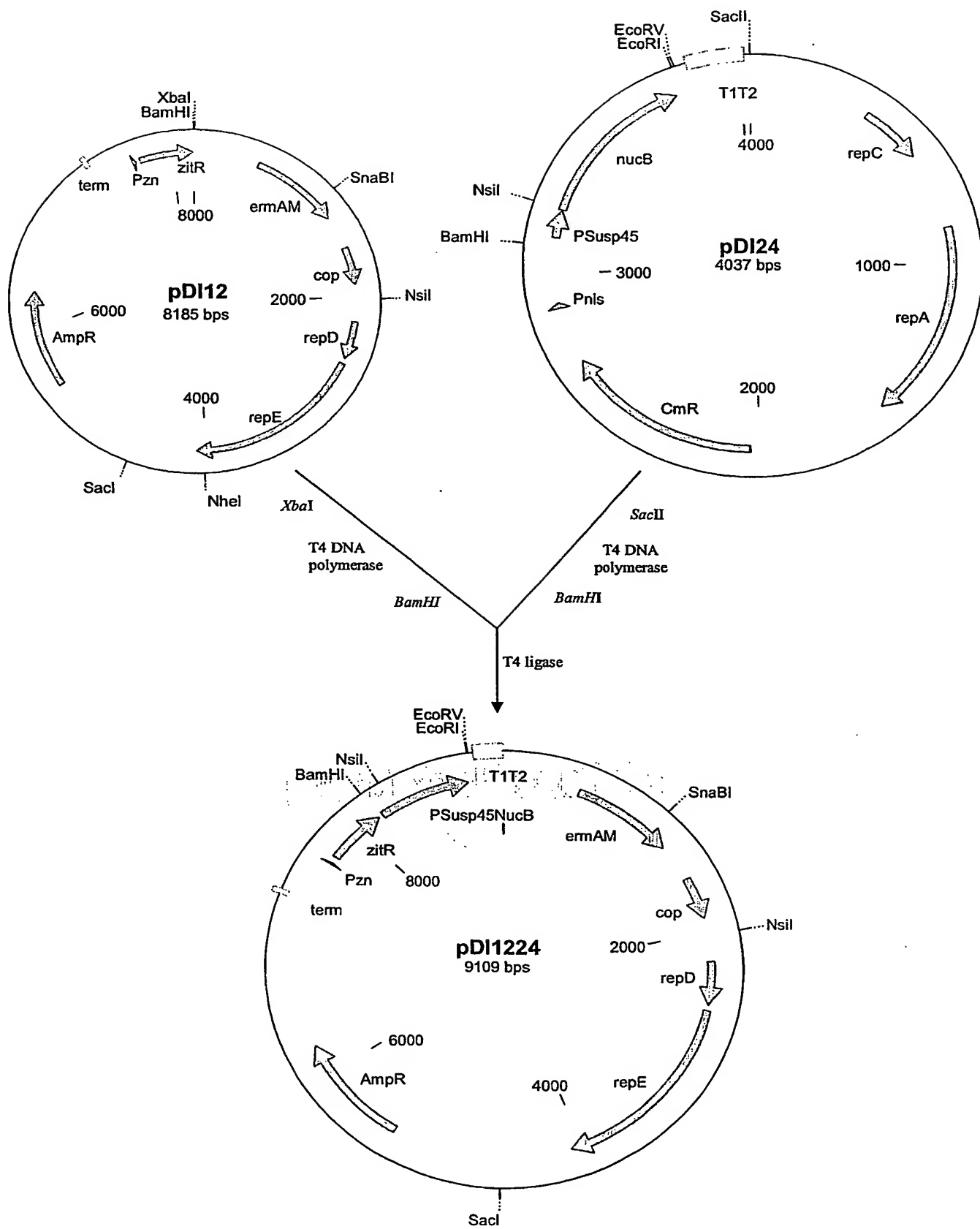
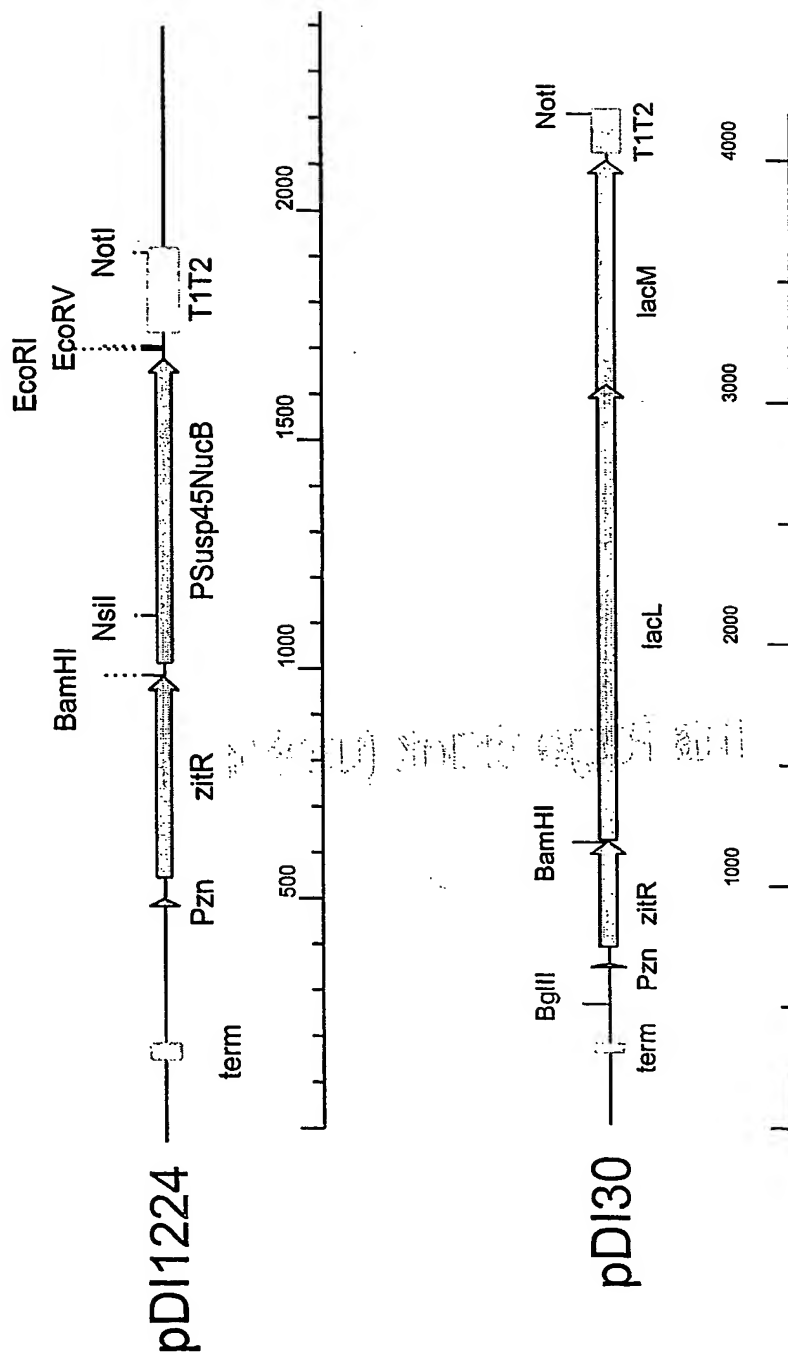


FIG. 5

***This Page Blank (uspto)***



système  $p_{zn}$ -zitR

FIG. 6

**This Page Blank (uspto)**



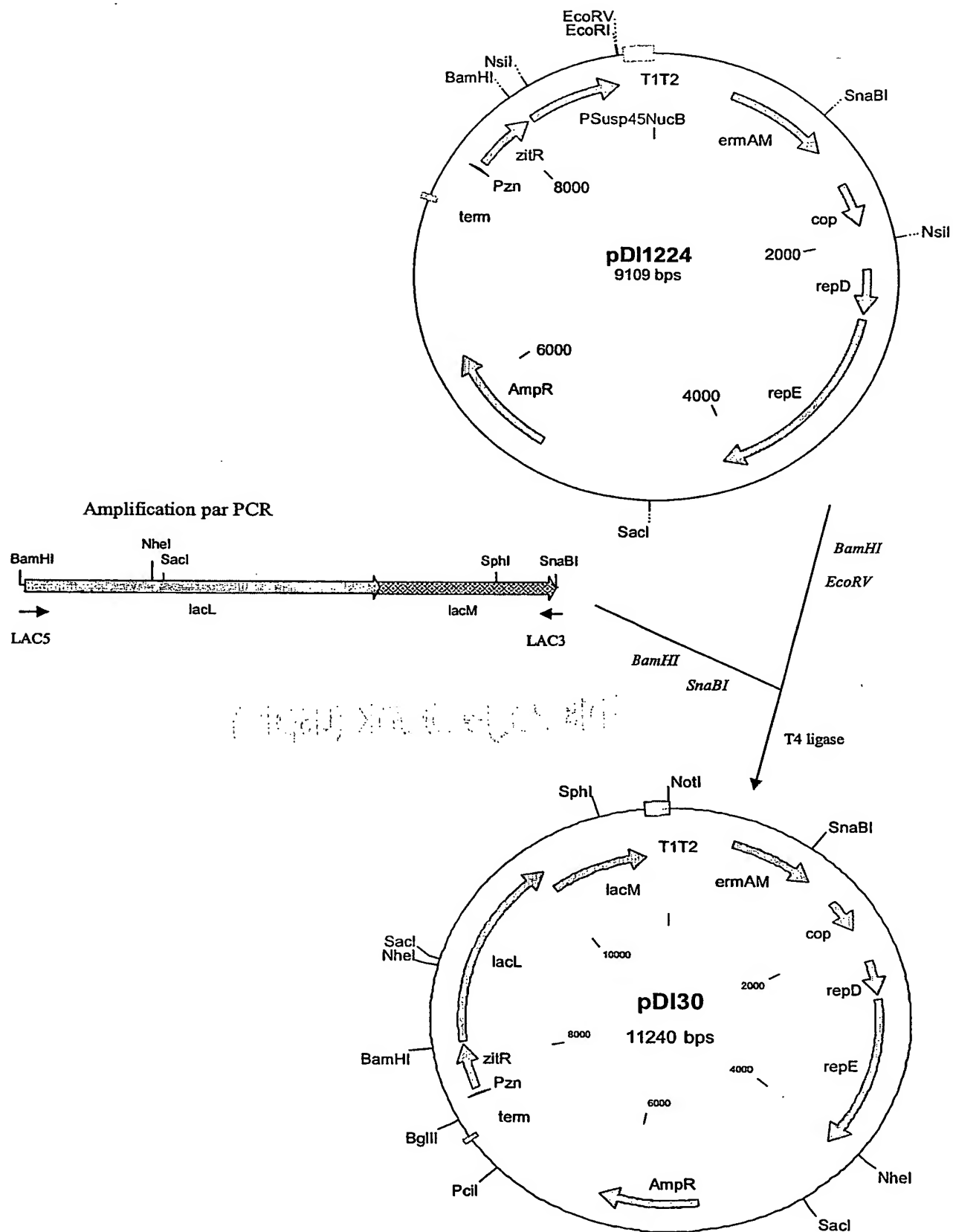


FIG. 7

**This Page Blank (uspto)**

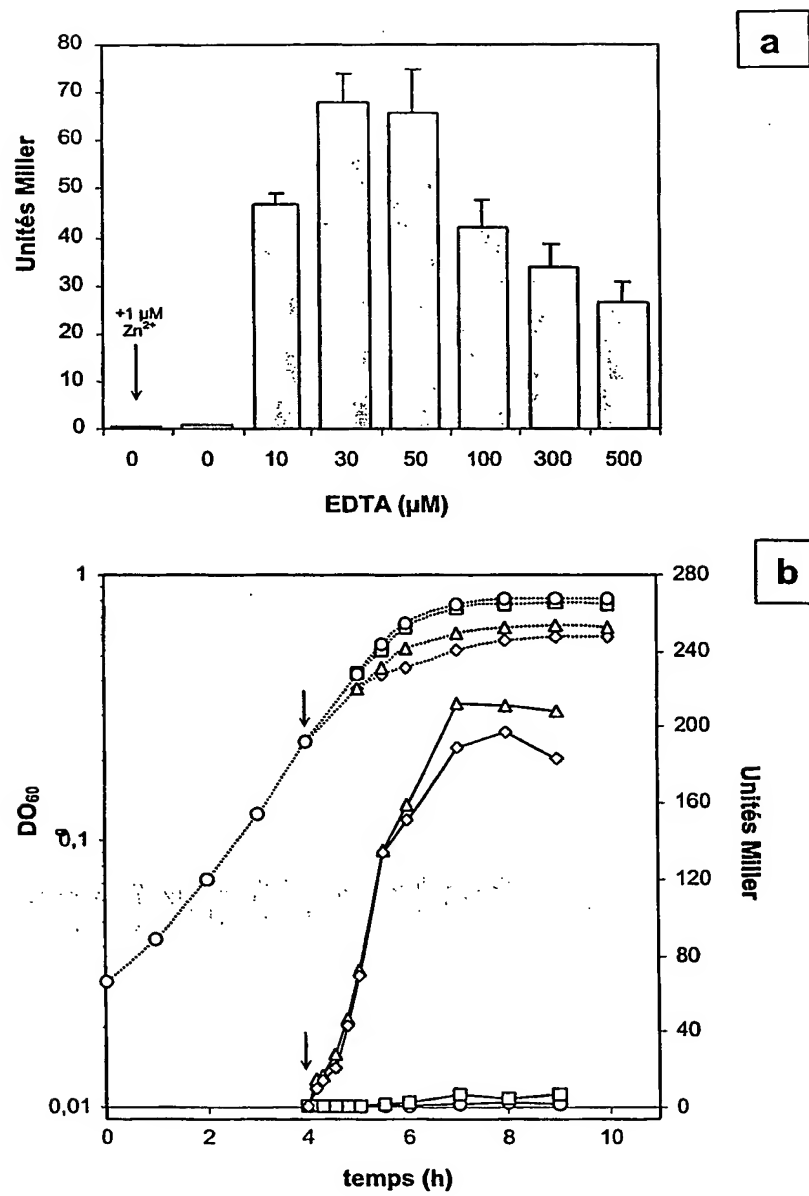


FIG. 8

**This Page Blank (uspto)**

## SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)  
Isabelle, POQUET  
Daniel, LLULL

<120> CASSETTES D'EXPRESSION PROCARYOTES REGULEES PAR LE ZINC

<130> MJPbv539/116

<150> FR 02 10805  
<151> 2002-08-30

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Séquence consensus du promoteur bactérien pzn

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (9)..(9)  
<223> N = A, C, G ou T

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(18)  
<223> N = A, C, G ou T

<220>  
<221> -35\_signal  
<222> (19)..(24)  
<223>

<400> 1  
aaaaataang tnnnnnnntt gacattattt tt

<210> 2  
<211> 47  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Séquence consensus du promoteur bactérien pzn

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (9)..(9)  
<223> N = A, C, G ou T

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (12)..(18)

<223> N = A, C, G ou T

<220>

<221> -35\_signal

<222> (19)..(24)

<223>

<220>

<221> misc\_feature

<222> (33)..(41)

<223> N = A, C, G ou T

<220>

<221> -10\_signal

<222> (42)..(47)

<223>

<400> 2

aaaaataang tnnnnnnntt gacattattt tttnnnnnnnn ntataat

47

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> misc\_feature

<222> (9)..(9)

<223> Y = T ou C

<220>

<221> -35\_signal

<222> (19)..(24)

<223>

<400> 3

aaaaataayg ttaactgggtt gacattattt tt

32

<210> 4

<211> 56

<212> DNA

<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> -35\_signal

<222> (19)..(24)

<223>

<220>

<221> -10\_signal

<222> (42)..(47)

<223>

<400> 4

aaaaataatg ttaactgggtt gacattattt ttacttttgct atataattaa ccagta

56

<210> 5

<211> 57

<212> DNA  
<213> Lactococcus lactis

<220>  
<221> -35\_signal  
<222> (20)..(25)  
<223>

<220>  
<221> -10\_signal  
<222> (43)..(48)  
<223>

<400> 5  
aaaaaataac gttaactggt tgacattatt tttcttttgc tatataatta accagta

57

<210> 6  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> Lactococcus lactis

<400> 6

Met Lys Lys Ile Asn Leu Ala Leu Leu Thr Leu Ala Thr Leu Met Gly  
1 5 10 15

Val Ser Ser Thr Ala Val Val Phe Ala  
20 25

<210> 7  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Amorce PCR

<400> 7  
ctaagtgcgc ggcttttt

18

<210> 8  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Amorce PCR

<400> 8  
gctctagagc gggatccttc atcgaaactc ttcag

35

<210> 9  
<211> 1100  
<212> DNA  
<213> Lactococcus lactis

<220>

<221> -35\_signal  
 <222> (295)..(300)  
 <223>

<220>  
 <221> -10\_signal  
 <222> (318)..(323)  
 <223>

<220>  
 <221> RBS  
 <222> (343)..(348)  
 <223>

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (362)..(362)  
 <223> N = A, C, G ou T

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (412)..(412)  
 <223> N = A, C, G ou T

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (445)..(445)  
 <223> N = A, C, G ou T

<220>  
 <221> RBS  
 <222> (780)..(786)  
 <223>

<400> 9  
 cacaggaaac agctatgacc atgattacgc caagctcgaa attaacccctc actaaaggga 60  
 acaaaagctg ggtaccgggc cccccctoga ggtcgacggt atcgatagcc cgcctaataga 120  
 gcgggctttt ttttgatata gaattaccgc ggaattcaga tctttgatca aggatctgtc 180  
 agctgggtca actagcgggt gtcaaactgt tagtaataaa acttattgtt ttgatgttcg 240  
 gcttaaggat ggaaggattt ttcaaataaa aaagtaaaaa ataattgtta ctggttgaca 300  
 ttatttttac tttgctatat aattaaccag taaactaatt atggaggaca aaatactatg 360  
 antttagcaa atcaaatacga ccagtttctt ggggcaatta tgcagtttgc anaaaacaag 420  
 catgaaatat tactcggcga atgcnaaagt aatgttaagc taacaagcac gcaagaacat 480  
 atcttaatga ttctagctgc agaggtttcg acaaacgcga gaattgccga gcaactcaag 540  
 atttcgccag cagcggtaac taaagctctc aaaaaattac aagagcaaga actgattaaa 600  
 tcaagtcggg caacaaatga cgaacgcgta gtcctttgga gcctgacaga aaaagcaatt 660  
 ccagttgcta aagaacatgc tgctcatcat gagaaaactc taagtaccta ccaagaatta 720  
 ygagacaaat ttactgacga agaacaaaaa gtgataagtc aattcttata agtacttacg 780



gaggagtttc gatgaagaaa atattgatgt tatttgctat tccggcagtt ttacttcttg 840  
ctgggtgtca aaaaacagca gacaaaccag aagttgtgac aacttttgag ccgatgtatg 900  
aatttacgaa agcgattgtt ggagataagg ttaaaattga aaatattgtt ccggcgaatc 960  
aagaagttca cgaatttgaa ccgagtgcc aacgaaaaa aatggtagaa aatgcaaaga 1020  
aaattgaagt cgagtttgac aaagggtcaaa gaactgataa atatggacgt ggcttagcgt 1080  
atatttatgc tgatggaaaa 1100

<210> 10  
<211> 160  
<212> DNA  
<213> Lactococcus lactis

<220>  
<221> -35\_signal  
<222> (123)..(128)  
<223>

<220>  
<221> -10\_signal  
<222> (146)..(151)  
<223>

<400> 10  
gatctgtcag ctggttcaac tagcgggtggc caaactgtta gtaataaaac ttattgtttt 60  
gatgttcggc ttaaggatgg aaggattttt caaataaaaa agtaaaaaat aatgttaact 120  
ggttgacatt atttttactt tgctatataa ttaaccagta 160

<210> 11  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Amorce PCR

<400> 11  
gttctaagga tccattaact taaggag 27

<210> 12  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence

<220>  
<223> Amorce PCR

<400> 12  
aagtagatgc atcagcaaat acaacggc 28

<210> 13

<211> 27  
 <212> PRT  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Peptide  
 <400> 13

Met Lys Lys Ile Asn Leu Ala Leu Leu Thr Leu Ala Thr Leu Met Gly  
 1 5 10 15

Val Ser Ser Thr Ala Val Val Phe Ala Asp Ala  
 20 25

<210> 14  
 <211> 10  
 <212> DNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> .Lieur d'insertion

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(2)  
 <223> N = A, C, G ou T

<400> 14  
 nnatgcatca